

PRIOLOG PROUČAVANJU EKSTRAKCIJE
NUKLEINSKIH KISELINA IZ MLADIH
BILJAKA SUNCOKRETA (*HELIANTHUS*
ANNUUS) FENOLDETERGENTNIM METODAMA*

With Summary in English

BOJANA GRUJIĆ-INJAC, STOJAN GRUJIĆ, SLAVKO KEVREŠAN,
JULIJAN KANDRAČ i RUDOLF KASTORI

(Prirodno-matematički fakultet, Beograd, Zavod za hemiju Univerziteta u Novom Sadu,
Novi Sad i Poljoprivredni fakultet, Novi Sad)

Primitljeno 11. 10. 1975.

Uvod

Poznato je iz literature da se native nukleinske kiseline (NK) iz biološkog materijala ekstrahuju primenom različitih fenol-detergentskih metoda (Fraenkel-Conrat 1956; Grierer i Schramm 1956, Stern 1968).

U novije vreme, u zavisnosti od materijala, za izolovanje nativnih NK upotrebljavaju se raznovrsni puferni sistemi sa pogodnim detergentima u prisustvu vodom zasićenog fenola. Uspešna primena detergentskih metoda sastoji se u tome što detergenti imaju osobinu da rastvaraju i denaturišu proteine čime se postiže deproteinizacija NK, a da se pri tom molekuli NK znatno ne oštećuju. Isto tako fenol omogućuje deproteinizaciju NK, jer ima svojstvo da rastvara neke belančevine i da raskida jonske i vodonične veze između NK i proteina. Pored toga fenol inhibitorno deluje i na aktivnost enzima ribonukleaze. Sem pogodnog detergenta i vodom zasićenog fenola za uspešnu ekstrakciju nativnih NK važnu ulogu ima temperatura medijuma za ekstrakciju i njegova pH vrednost.

U zavisnosti od prirode biološkog materijala, ekstrakcija nativnih NK negde ide relativno lako, a negde su potrebni posebni tretmani. Mi smo u našem radu naišli na velike poteškoće pri ekstrakciji NK iz listova suncokreta. Naime, ispostavilo se da se iz mladih listova suncokreta (starih oko 15 dana) ekstrakcija nativnih nukleinskih kiselina ne može izvršiti uobičajenim fenol-detergentskim metodima, a kojima se vrlo uspešno NK izoluje iz mladih listova kukuruza ili graška. Treba takođe istaći da je

* Rad saopšten na II. simpozijumu Jugoslovenskog društva za biljnu fiziologiju, Stubičke Toplice, 20—25. 5. 1975.

suncokret veoma značajna poljoprivredna kultura, i da se često upotrebljava kao objekat istraživanja ili kao »test« biljka u raznim fiziološkim, patofiziološkim i drugim ogledima. Iz navedenih razloga proučavanje ekstrakcije NK iz biljaka suncokreta ima i širi značaj.

U cilju iznalaženja što pogodnijeg postupka za izolovanje nativnih NK iz lišća suncokreta, mi smo ispitili četiri različita metoda za ekstrakciju, a dobivene preparate NK okarakterisali u UV spektru (na talasnim dužinama 230, 260 i 280 nm) i hromatografskim razdvajanjem na koloni od metilovanog albumina i kieselguhra.

Materijal i metodi

Biljni materijal i gajenje biljaka. Za ova ispitivanja, korišćeno je seme suncokreta (*Helianthus annuus*) sorte »Peredovik«. Nakon temeljnog pranja, seme je stavljeno na klijanje u destilovanu vodu na temperaturi od 26 °C u termostatu. Posle tri dana, ponici su preneti na hranjivi rastvor Knopa, kome su dodati i neophodni mikroelementi. Sedam odnosno petnaest dana nakon prenošenja ponika na hranjivi rastvor sa mladih biljaka skidani su listovi iz kojih se prema određenom postupku vršila ekstrakcija nativnih nukleinskih kiselina.

Ekstrakcija nativnih nukleinskih kiselina. Za izolovanje nativnih nukleinskih kiselina iz lišća suncokreta pokušali smo da primenimo postupak koji je razrađen u našoj laboratoriji za izolovanje NK iz mladih biljaka kukuruza (Grujić i dr. 1972.). To je fenol-detergentska metoda pri čemu se upotrebljava puferni sistem koji sadrži 0,14 M NaCl i 0,05 M Na-fosfata pH 7,6. Za deproteinizaciju ovom sistemom se dodaje natrijumdodecilsulfat (DDS) da njegova koncentracija bude 0,5% kao i jednaka zapremina sveže predestilisano fenola zasićenog vodom, a kojem je na jedan litar prethodno dodato 0,001 M EDTA i 1 gram 8-oksihinolina.

Ekstrakciju nukleinskih kiselina vršili smo i metodom Fedine i Kulave (1966). U ovom postupku se upotrebljava 0,01 M Tris-HCl puferni sistem pH 7,8 uz dodatak dodecilsulfata do 0,75% kao i jednaka zapremina fenola zasićenog vodom. Deproteinizacija NK u ovom sistemom vrši se na 50 °C u trajanju od 5 min. što se bitno razlikuje od drugih fenoldetergentskih metoda gde se ekstrakcija vrši po pravilu na 0 °C.

Za ekstrakciju NK iz biljnog materijala preporučuje se i metoda Konareva i Tjutereva (1970), koju smo takođe ispitivali. U ovom postupku koristi se puferni sistem pH 6,0 koji sadrži 0,05 M Na-fosfata, 0,35 M NaCl, 0,01 M $MgCl_2$ i 5% natrijumove soli paraaminosalicilne kiseline. Homogenizacija tkiva se vrši u tečnom azotu a neposredno pre ekstrakcije NK navedenom pufernom sistemom se dodaje natrijumdodecilsulfat do koncentracije 0,5%. Daljnja homogenizacija vrši se na hladno u porcelanskom avanu sa kvarcnim peskom u trajanju od 15 min. Nakon intenzivne homogenizacije, homogenatu se dodaje još dvostruka zapremina navedenog pufernog sistema za ekstrakciju kao i ista zapremina fenola zasićena vodom čiji je pH 6,0. Deproteinizacija se vrši mešanjem suspenzije na sobnoj temperaturi 40 minuta. Centrifugovanjem na hladno na 2.500 xg odvaja se vodena faza, a zaostali sloj (fenol sa tkivom i denaturisanim belančevinama) tretira se sa trostrukom zapreminom navedenog rastvora za ekstrakciju i sve operacije ponove. Vodene faze iz obe ekstrakcije se spajaju, a fenol iz zaostalog sloja se odstranjuje, pa se tkivo i denaturisane belančevine ponovo tretiraju rastvorom za ekstrakciju i istom zapreminom fenola pH 6,0. Deproteinizacija se vrši uz meša-

nje na 65 °C u trajanju od 20 minuta. Potpunija deproteinizacija NK iz sva tri vodena sloja obrađuje se nekoliko puta fenolom zasićenim vodom, da bi se na kraju iz vodenog sloja NK taložile hladnim 96% etanolom.

Za razliku od uobičajenih postupaka za ekstrakciju NK, postupak Konareva i Tjutereva (1970) se karakteriše time što se ekstrakcija vrši u kiselom medijumu (pH 6,0) uz prisustvo dva detergenta i znatno veće zapremine pufernog sistema i fenola u odnosu na tkivo, kao i da se zadnja reekstrakcija vrši na 65 °C.

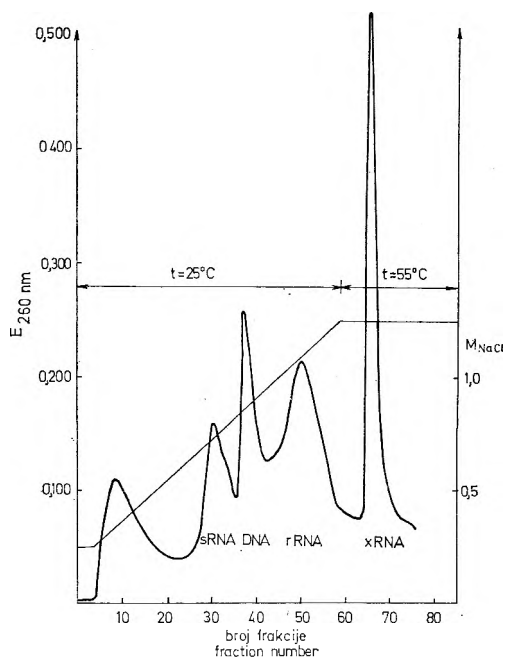
Postupak Konareva i Tjutereva (1970) pokazao se vrlo uspešno samo za mlade listove suncokreta (sedam dana starosti), dok je ekstrakcija DNK iz starijih listova (15 dana starosti) bila nepotpuna. Zbog toga smo mi modifikovali ovaj postupak tako što smo primenili alkalni puferni sistem i alkalni fenol (pH 7,6) za ekstrakciju nukleinskih kiselina, s tim da su hemijske komponente ostale iste kao i po metodi Konareva i Tjutereva (1970). Zadnja reekstrakcija nukleinskih kiselina na višoj temperaturi 65 °C vršena je pri pH 6,0 kako bi ekstrakcija eventualno zaostalih NK bila što potpunija.

Hromatografsko razdvajanje nukleinskih kiselina. — Razdvajanje ukupnih nukleinskih kiselina na pojedine grupe vršeno je kolonskom hromatografijom, na hromatografskom stubu koji je bio izgrađen od metilovanog goveđeg albumina i Kieselguhra (MAK-kolona). Metilovanje goveđeg albumina obavljeno je prema postupku Hayashia et al. (1963). Nosač metilovanog albumina u hromatografskom stubu bio je Kieselguhr firme »Merck« koji je posebno obrađen radi otklanjanja eventualno prisutnih jonova. Samo pripremanje hromatografske kolone kao i frakcionisanje NK vršeno je u osnovu po metodi Mandella i Hersheya (1960) sa izvesnom modifikacijom Grujića i Grujić-Injac (1972). Naime, nakon eluiranja uobičajenih grupa NK na sobnoj temperaturi (25 °C) povećanjem koncentracionog gradienta NaCl, vršeno je eluiranje i na 55 °C sa 1,25 M NaCl pri čemu je dobivena još jedna frakcija RNK. Detalji tog postupka kao i način pripremanja Kieselguhra i hromatografske kolone opisano je u našem ranijem radu (Grujić i Grujić-Injac, 1972).

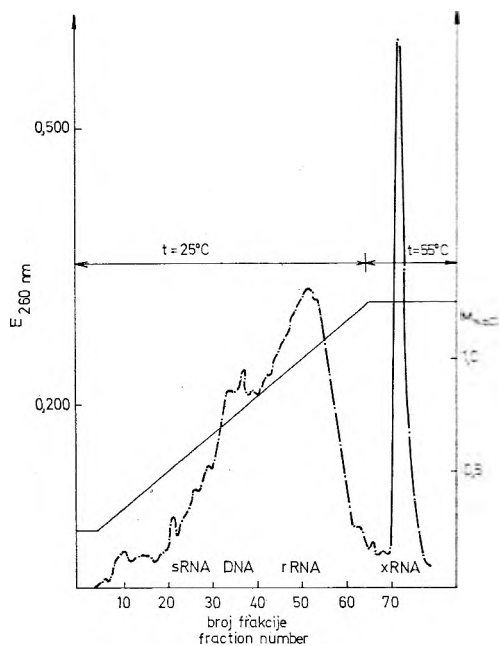
Rezultati i diskusija

Rezultati o karakteristikama preparata nukleinskih kiselina izolovanih različitim postupcima prikazani su u tabeli 1 i slikama od 1 do 6.

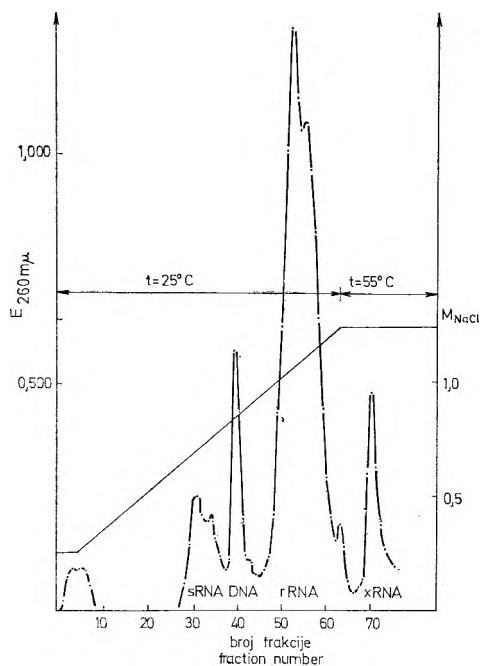
U tabeli 1. prikazan je odnos ekstinkcija preparata NK izolovanih različitim postupcima na karakterističnim talasnim dužinama. Iz navedenih podataka može se videti da zadovoljavajuće odnose (E_{260}/E_{230} ; E_{260}/E_{280} i E_{280}/E_{230}) kojim se ocenjuje kvalitet preparata NK, imaju samo preparati koji su dobijeni postupkom Konareva i Tjutereva (1970) iz mladih listova, i preparati koji su dobiveni modifikovanim postupkom Konareva i Tjutereva, i to kako iz mladih tako i iz starih listova. Naime, vrednosti za E_{260}/E_{230} i E_{260}/E_{280} u pomenutim preparatima kreću se između 1,80 i 2,20 dok su vrednosti E_{280}/E_{230} između 0,90 i 1,10 što je u saglasnosti sa vrednostima preparata za čiste native nukleinske kiseline. Naš postupak (Grujić et al. 1972), koji smo mi razradili za izolovanje NK iz mladih listova kukuruza, zatim postupak Fedine i Kulaeve (1966) kao i postupak Konareva i Tjutereva (1970) kod starih listova suncokreta, ne daje preparate sa zadovoljavajućim vrednostima karakterističnih ekstinkcionih odnosa, jer su ispod 1,80. Pored toga prinosi preparata dobijeni u ovira postupcima bili su relativno mali, a i žućkasto obojeni što sve ukazuje da su pomenuti postupci za taj materijal nepodobni.



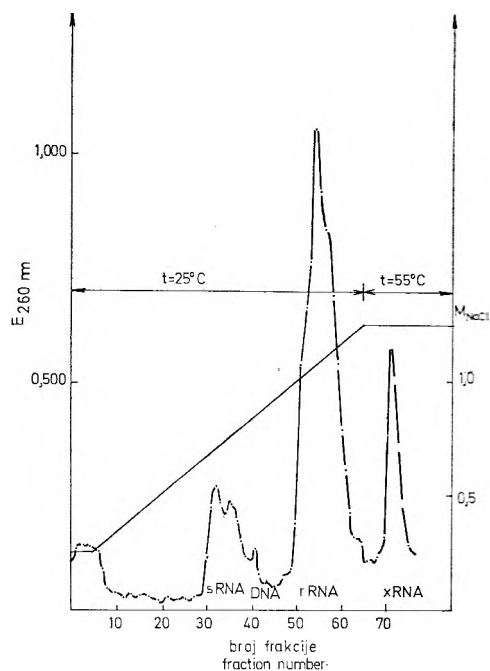
Sl. 1. — Fig. 1.



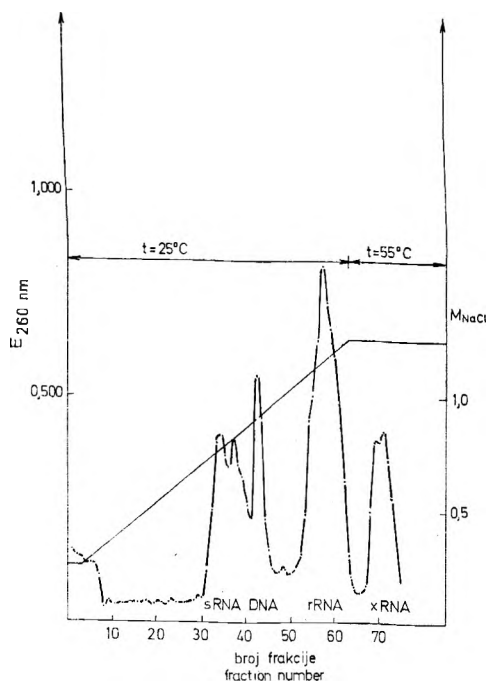
Sl. 2. — Fig. 2.



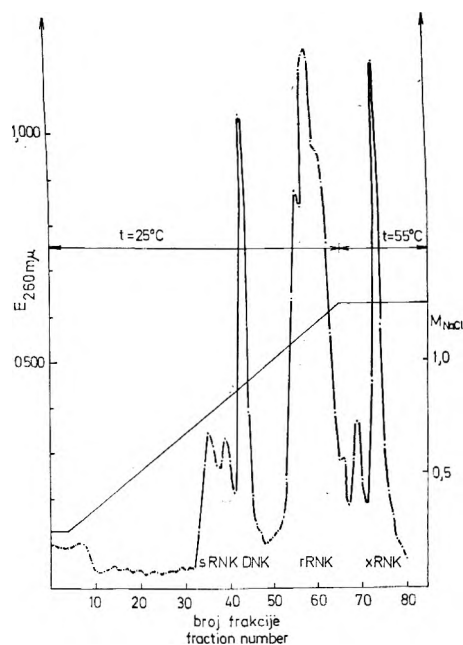
Sl. 3. — Fig. 3.



Sl. 4. — Fig. 4.



Sl. 5. — Fig. 5.



Sl. 6. — Fig. 6.

Sl. 1. Eluacioni dijagram NK izolovanih iz mladih listova prema postupku Grujić i dr. (1972)

Fig. 1. Elution diagram of NA isolated from young leaves by the method of Grujić et al. (1972)

Sl. 2. Eluacioni dijagram NK izolovanih iz mladih listova prema postupku Fedine i Kuleave (1966)

Fig. 2. Elution diagram of NA isolated from young leaves by the method of Fedina and Kulaeva (1966)

Sl. 3. Eluacioni dijagram NK izolovanih iz mladih listova prema postupku Konareva i Tjutereva (1970)

Fig. 3. Elution diagram of NA isolated from young leaves by the method of Konarev and Tjuterev (1970)

Sl. 4. Eluacioni dijagram NK izolovanih iz starih listova prema postupku Konareva i Tjutereva (1970)

Fig. 4. Elution diagram of NA isolated from old leaves by the method of Konarev and Tjuterev (1970)

Sl. 5. Eluacioni dijagram NK izolovanih iz starih listova prema modifikovanom postupku Konareva i Tjutereva

Fig. 5. Elution diagram of NA isolated from old leaves by the modified method of Konarev and Tjuterev

Sl. 6. Eluacioni dijagram NK izolovanih iz mladih listova prema modifikovanom postupku Konareva i Tjutereva

Fig. 6. Elution diagram of NA isolated from young leaves by the modified method of Konarev and Tjuterev

Tabela 1. Odnosi ekstinkcija preparata NK na karakterističnim talasnim dužinama izolovanih različitih metodama

Table 1. Ratio of the extinctions of NA preparations at characteristic wavelengths isolated by different methods

Metode Methods	Organ biljke Organ of plant	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$	$\frac{E_{260}}{E_{280}}$	$\frac{E_{280}}{E_{230}}$
1. Grujić i dr.	mladi list (young leaf)	1,28	1,66	0,76
2. Fedina i Kulaeva	mladi list (young leaf)	1,69	1,84	0,92
3. Konarev i Tjuterev	mladi list (young leaf)	1,91	2,13	0,89
4. Konarev i Tjuterev	stari list (old leaf)	1,64	1,80	0,91
5. Konarev i Tjuterev Modifikovan metod Modified method	stari list (old leaf)	1,82	1,89	0,96
6. Konarev i Tjuterev Modifikovan metod Modified method	mladi list (young leaf)	1,84	1,95	0,94

Da bismo još bolje okarakterisali dobivene preparate NK, mi smo ih frakcionisali na MAK-koloni, pri čemu smo dobili odgovarajuće eluacione dijagrame koji su prikazani na slikama 1—6.

Na sl. 1. prikazan je eluacioni dijagram preparata NK koji je dobiven postupkom razrađenim u našoj laboratoriji (Grujić i dr. 1972.), a koji se uspešno upotrebljava za izolovanje NK iz listova kukuruza. Iz dijagrama se vidi da se dobivaju uobičajene četiri grupe NK (sRNK, DNK, rRNK i xRNK).

Treba istaći da smo prisustvo frakcije xRNK koja se sa MAK-kolone eluira na 55 °C ustanovili već i ranije u mladim listovima kukuruza (Grujić i Grujić-Injac (1972). Prema radovima Hadziyeva et al. (1968) ta frakcija bi mogla da predstavlja messenger RNA (mRNA), iako je zastupljena u znatnoj količini (u našim uzorcima do 16% od ukupno eluiranih grupa NK), jer se ta frakcija čvrsto vezuje za MAK-kolonu. U radovima Keya (1972) ističe se da je frakcija koja je čvrsto vezana za MAK-kolonu bogata sadržajem adenilne kiseline. Za razliku od našeg postupka, Key tu frakciju eluira sa MAK-kolone pomoću natrijumdodecilsulfata i označava je kao »TB-RNA« (tightly bound).

Iz eluacionog dijagrama takođe se uočava da je razdvajanje pojedinih grupa NK relativno slabo na MAK-koloni, kao i da je pik rRNK neuobičajeno mali u odnosu na pik DNK.

Na sl. 2. prikazan je eluacioni dijagram preparata NK dobiven metodom Fedine i Kulaeve (1966). Slabo razdvajanje frakcija kao i neodgovarajuća veličina pojedinih pikova takođe ukazuje da su dobiveni preparati lošeg kvaliteta.

Na sl. 3. prikazan je eluacioni dijagram preparata NK iz mladih listova suncokreta (7 dana) po postupku Konareva i Tjutereva (1970). Iz dijagrama se vidi da je razdvajanje NK na pojedine grupe sasvim uspešno i da je pik rRNK u odnosu na DNK znatno veći (oko 6 puta) i predstavlja očekivani odnos rRNK/DNK.

Na sl. 4. predstavljen je eluacioni dijagram preparata NK dobijen takođe po metodi Konareva i Tjutereva (1970), ali iz starijih listova (15 dana). Iz dijagrama se uočava da je pik DNK neuobičajeno malen, što znači da se pri tom postupku iz starijih listova DNK vrlo slabo ekstrahuje. Uzrok tome je svakako kiseli medijum pufernog sistema i fenola za ekstrakciju (pH 6,0) pri čemu ne može da dođe do deproteinizacije dezoksinukleoproteina. Iz toga se može zaključiti da su veze između DNK i proteina u starijim listovima suncokreta znatno čvršće od veza u mladim listovima, gdje ima svakako i više slobodne DNK, pa se ona ekstrahuje i u kiselom medijumu. Toj pretpostavci ide u prilog i činjenica da je pik za DNK znatno veći ako se ekstrakcija NK iz starijih listova obavi modifikovanim postupkom Konareva i Tjutereva u alkalnom medijumu pri pH 7,6.

Eluacioni dijagram preparata NK koji je dobiven modifikovanim postupkom Konareva i Tjutereva u alkalnom medijumu, prikazan je na sl. 5. Iz dijagrama se jasno uočava da se u starijim listovima pri alkalnoj ekstrakciji vrši bolja deproteinizacija DNK, jer je pik za DNK veličine koja je očekivana u odnosu na pik rRNK.

Na sl. 6. prikazan je eluacioni dijagram preparata NK dobiven iz mladih listova po modifikovanom metodu Konareva i Tjutereva. Iz dijagrama se vidi da je razdvajanje pojedinih grupa NK sasvim uspešno, a i odnos rRNK/DNK (oko 6) je sličan odnosu koji je dobijen pri kiselom ekstrakciji NK Konareva i Tjutereva (1970) iz mladih listova.

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je za ekstrakciju NK iz listova suncokreta (mladih i starih) najpogodniji modifikovan metod Konareva i Tjutereva, gde se ekstrakcija vrši u alkalnom medijumu (pH 7,6), a poslednja reekstrakcija na višoj temperaturi (65 °C) se vrši u kiselom medijumu (pH 6,0). Takav postupak daje dobar prinos, nebojeni preparat i dobre karakterističke vrednosti za kvalitet preparata NK iz mladih i iz starih listova suncokreta.

Z a k l j u č a k

U ovom radu ispitano je više postupaka za izolovanje nativnih nukleinskih kiselina iz mladih i starih listova suncokreta.

Nađeno je da se ne mogu svi uobičajeni postupci za izolovanje nativnih nukleinskih kiselina iz biljnog materijala uspešno primeniti i na listove suncokreta. Pri izolovanju NK iz mladih listova sasvim zadovoljavajuća ekstrakcija i kvalitet preparata dobija se metodom Konareva i Tjutereva (1970). Međutim taj se postupak ne može primeniti za izolovanje NK iz starijih listova, jer je ekstrakcija DNK vrlo slaba što ukazuje na to da su veze između DNK i proteina znatno čvršće nego u mladim listovima gde svakako ima i slobodne DNK.

Od ispitivanih metoda, najpogodnija ekstrakcija nukleinskih kiselina iz mladih i iz starih listova postiže se modifikovanom metodom Konareva i Tjutereva, gde se ekstrakcija vrši u alkalnom medijumu (pH 7,6), a poslednja reekstrakcija na višoj temperaturi (65 °C) izvodi se u kiselom medijumu (pH 6,0). Prinosi preparata dobijeni ovim postupkom bili su zadovoljavajući, a karakteristične vrednosti za kvalitet bile su u okviru vrednosti za native NK.

L i t e r a t u r a

- Fedina, A. B. i O. N. Kulaeva, 1966: Uslovia vydelenija ribonukleinovoj kisloty iz prorostkov i list'ev rastenij, *Fiziologija rastenij* 13, 368.
- Fraenkel-Conrat, H. A., 1956: The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 882.
- Grierer, A. u. G. Schramm, 1956: Die Infectiosität der Nucleinsäure aus Tabakmosaik virus, *Z. Naturforsch.* 11, 138.
- Grujić, S. i I. B. Grujić-Injac, 1972: Razdvajanje nukleinskih kiselina iz kukuruza na koloni od metilovanog humanog albumina. *Glasnik Hem. društva Beograd* 37, 481.
- Grujić, S., J. Kandrač i S. Kevrešan, 1972: Izolovanje nukleinskih kiselina iz ponika kukuruza fenoldetergentskim metodama, *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu* 16, 93.
- Hayashi M., M. N. Hayashi and S. Spigelman, 1963: Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA, *Biochemistry* 50, 664.
- Kirby, K. S., 1956: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues, *Biochem. J.* 64, 405.
- Konarev, G. V. i L. S. Tjuterev, 1970: Metody biohimii i citohimii nukleinovyyh kislot rastenij, izdatel'stvo »Kolos«, Leningrad.
- Mandell, J. D. and A. D. Hershey, 1960: A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids, *Anal. Biochem.* 1, 66.
- Stern, H., 1968: in "Methods in Enzymology", Editors Colowick P. and Kaplan N., Academic Press, New York — London, Vol. XII, Part B str. 100.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDIES OF NUCLEIC ACIDS EXTRACTION FROM YOUNG SUNFLOWER PLANTS BY PHENOL-DETERGENT METHODS

Bojana Grujić-Injac, Stojan Grujić, Slavko Kevrešan, Julijan Kandrač and Rudolf Kastori

(Faculty of Science, Beograd, Institute of Chemistry, University of Novi Sad, and Faculty of Agriculture, Novi Sad)

It is possible to carry out the isolation of native nucleic acids from higher plants by basically different phenoldetergent methods. Considering the nature of biological material, extraction of native NA proved sometimes to be relatively easy while at other times it requires particular treatment. This paper deals with various procedures for the isolation of native NA from young (7-days old) and older (15-days old) sunflower leaves (*Helianthus annuus*).

It was found that the common procedures for the isolation of native NA from plant material couldn't be successfully applied for the analyses of sunflower leaves. An extremely satisfactory extraction and preparation quality was obtained through isolation of NA from young leaves by the method K o n a r e v and T j u t e r e v (1970). However, it couldn't be applied for the isolation of NA from older leaves, as the extraction of DNA is very poor, indicating significantly stronger bonds between DNA and proteins in young leaves, which, of course, contain free DNA too.

The most convenient extraction of NA from both young and old leaves has been obtained by the modified method of K o n a r e v and T j u t e r e v, where extraction is occurring in an alkali media (pH 7.6), and the last reextraction at higher temperature (65 °C) in an acidic media (pH 6.0). Preparations yield obtained by this procedure was satisfactory and the characteristic values for quality were in the range of values for native NA.

Dr Bojana Grujić-Injac
Prirodno-matematički fakultet
11000 Beograd (Jugoslavija)

Dr Stojan Grujić
Slavko Kevrešan, dipl. hem.
Julijan Kandrač, dipl. hem.
Zavod za hemiju Univerziteta u Novom Sadu
21000 Novi Sad (Jugoslavija)

Dr Rudolf Kastori
Poljoprivredni fakultet
21000 Novi Sad (Jugoslavija)